



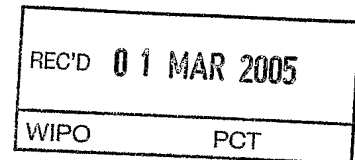
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0005114  
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 01월 27일  
Date of Application  
JAN 27, 2004

출원인 : 학교법인조선대학교  
Applicant(s) Chunsun University Co.,Ltd.



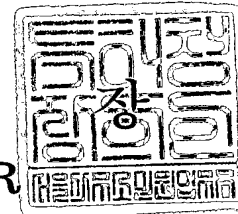
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2005 년 01 월 17 일

특 허 청  
COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2004.01.27
【발명의 명칭】	암세포주에 항암활성을 지닌 인디루빈 유도체
【발명의 영문명칭】	Indirubin derivatives having anticancer property against human cancer cell line
【출원인】	
【명칭】	학교법인조선대학교
【출원인코드】	2-1999-900160-6
【대리인】	
【성명】	김동완
【대리인코드】	9-1998-000076-3
【포괄위임등록번호】	2003-026089-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김용철
【성명의 영문표기】	KIM,Yong Chul
【주민등록번호】	650227-1001615
【우편번호】	506-769
【주소】	광주광역시  광산구 월계동 동부아파트 106-1004
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	김시욱
【출원인코드】	4-2003-014793-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김태성
【성명의 영문표기】	KIM,Tae Sung
【주민등록번호】	610601-1001414
【우편번호】	500-160
【주소】	광주광역시  북구 일곡동 동아아파트 105동 602호
【국적】	KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 이상국  
 【성명의 영문표기】 LEE, Sang Kook  
 【주민등록번호】 610824-1823218  
 【우편번호】 133-775  
 【주소】 서울특별시 성동구 행당동 대림아파트 110-501  
 【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 김재일  
 【성명의 영문표기】 KIM, Jae Il  
 【주민등록번호】 591023-1122410  
 【우편번호】 506-302  
 【주소】 광주광역시 광산구 월계동 금광아파트 102-1006  
 【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 문명주  
 【성명의 영문표기】 MOON, Myoung Ju  
 【주민등록번호】 800407-2787814  
 【우편번호】 711-832  
 【주소】 대구광역시 달성군 화원읍 명곡1리 명곡미래빌 109-1502  
 【국적】 KR

## 【심사청구】

청구

## 【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 김동완 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】	30 면	38,000 원
【가산출원료】	0 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	2 항	173,000 원
【합계】	211,000 원	
【감면사유】	학교	
【감면후 수수료】	105,500 원	

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 인간 암세포주에 항암활성 및 백혈병 세포주에 분화유도를 통한 세포사멸 효능을 지닌 인디루빈 유도체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 CDK(Cyclin-dependent kinase) 저해제로 알려져 있는 인디루빈의 유도체를 합성하고 인간 암세포주의 성장억제 저해 활성 및 백혈병 세포주에 분화유도를 통한 세포사멸 효능 측정을 통해 선택적으로 백혈병 세포주 및 각종 암세포주에 암세포 저해 기능이 탁월한 신규한 인디루빈 화합물을 개발한 것이다.

**【색인어】**

항암활성, 인디루빈, CDK 저해제, 백혈병 세포주, 폐암 세포주

**【명세서】****【발명의 명칭】**

암세포주에 항암활성을 지닌 인디루빈 유도체{Indirubin derivatives having anticancer property against human cancer cell line}

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<1> 본 발명은 인간 암세포주에 항암활성 및 백혈병 세포주에 분화유도를 통한 세포사멸 효능을 지닌 인디루빈 유도체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 CDK(Cyclin-dependent kinase) 저해제로 알려져 있는 인디루빈의 유도체를 합성하고 인간 암세포주의 성장억제 저해 활성 및 백혈병 세포주에 분화유도를 통한 세포사멸 효능 측정을 통해 선택적으로 백혈병 세포주 및 각종 암세포주에 암세포 저해 기능이 탁월한 신규한 인디루빈 화합물을 개발한 것이다.

<2> 기존 항암 치료제로 쓰이는 인간 암세포 분화 유도제는 그 독성이 강해 높은 용량으로 투여하기 어려워 그 적용에 한계가 있었다. 따라서 본 발명에서는 통상의 분화유도제와 인디

루빈 유도체를 병용 투여함으로써 저용량으로 통상의 분화유도제와 시너지효과를 발휘하여 분화유도를 통한 암세포 사멸효과를 나타낼 수 있는 인디루빈 유도체를 개발한 것이다.

<3>      한약 생약제의 주요 활성성분 중의 하나인 인디루빈이 암세포주에 항암활성을 지니는 것이 알려져 있다. Hoessel 등은 Nature Cell Biology Vol. 1 May 1999에서 인디루빈이 CDK(Cyclin-dependent kinase)의 활성을 저해하는 물질임을 개시한 바 있다.

<4>      또한 대한민국 공개특허공보 제2000-6570호 '생리활성 추출물'에서는 자연 인디고 식물에서 인디루빈을 추출하는 방법을 개시하고 있으며, 대한민국 공개특허공보 제1998-25557호 '이원상 고농도 세포배양을 활용한 천연 인디루빈의 생산방법'에서는 생물 반응기에서 고농도로 배양하여 인디루빈을 생산하는 방법을 개시하고 있다.

<5>      한편 본 발명자들도 대한민국 공개특허공보 제2003-36580호 '신규한 옥시게네이즈 유전자를 내포시킨 재조합 대장균을 이용한 인디고 및 인디루빈의 생물학적 제조방법'을 개시한 바 있다.

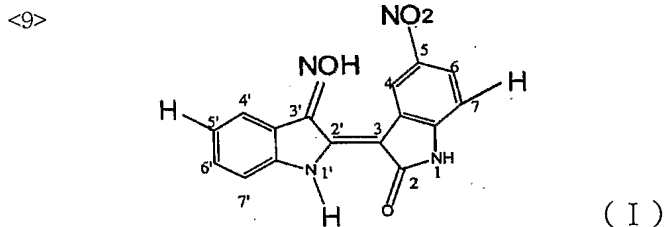
<6>      본 발명에서는 공지된 인디루빈 모핵을 중심으로 여러 유도체를 합성하고 그 항암활성을 측정 분석하였다. 이러한 분석을 통해 매우 낮은 농도에서 혼합처리에 의하여 기존 분화유도제 보다 우수한 항암효과를 지닌 화합물의 존재를 확인하기 위한 시험을 진행한 것이다.

## 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

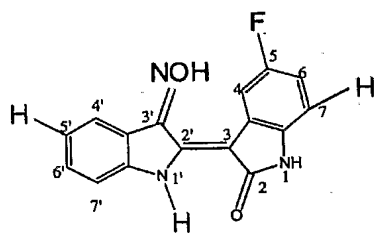
<7> 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 공지된 인디루빈 모핵을 중심으로 여러 유도체를 합성하고 그 항암활성을 측정 분석한 결과 매우 낮은 농도에서 혼합처리에 의하여 기존 분화유도제 보다 우수한 항암효과를 지닌 화합물을 합성 개발한 것이다. 본 발명에서는 인디루빈 모핵에 특정기를 치환시킬 때 통상 예견되는 활성보다 매우 우수한 항암활성 및 낮은 독성을 지닌 화합물을 발명한 것이다.

## 【발명의 구성 및 작용】

<8> 본 발명은 하기 구조식 (I)~(V)로 표시되는 인간 암세포주에 항암활성 및 백혈병 세포주에 분화유도를 통한 세포사멸 효능을 지니고 싸이클린-디펜던트 키나제(CDK) 저해 활성을 지닌 인디루빈 화합물을 제공하는 것이다.

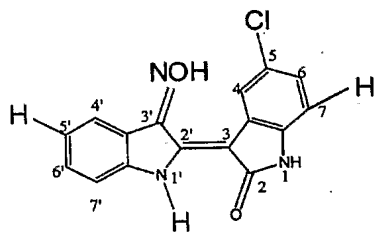


&lt;10&gt;



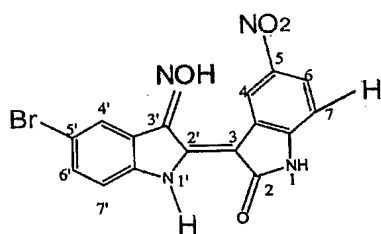
(II)

&lt;11&gt;



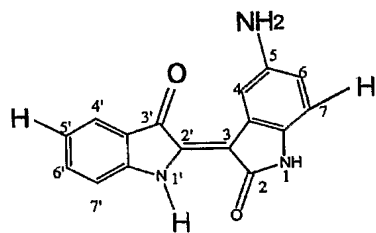
(III)

&lt;12&gt;



(IV)

&lt;13&gt;



(V)

&lt;14&gt;

또한 본 발명은 상기 구조식 (I)~(V)로 표시되는 인디루빈 화합물을 1종 이상 포함하는 항암활성제 조성물을 제공하는 것이다.

&lt;15&gt;

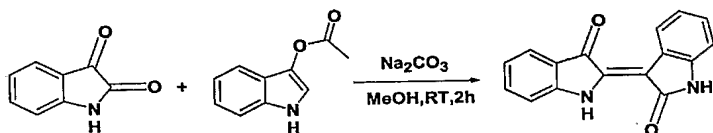
이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

&lt;16&gt;

본 발명에 사용된 인디루빈 화합물의 합성방법은 다음과 같다.

## &lt;17&gt; 1. 인디루빈의 합성

&lt;18&gt;

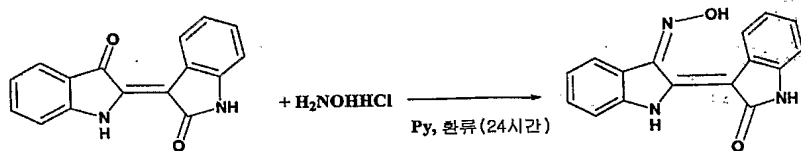


&lt;19&gt;

진공 상태에서 50ml 둥근바닥 플라스크에 인독실아세테이트(indoxyl acetate)(176mg, 1mmol)을 넣고 MeOH(5ml)에 녹인다. 이사틴(isatin)(148mg, 1mmol)과 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(265mg, 2.5mmol)를 첨가하고 실온에서 2시간 정도 교반한다. TLC(R<sub>f</sub>=0.4 에틸아세테이트/헥산 1/2 v/v)를 이용하여 반응의 종결을 확인하고, 조 상태의 생성물을 하루 정도 결정 덩어리가 생길 때까지 냉장고에 보관한다. 결정체가 생기면 여과시켜 용매를 제거한 후, 여과액은 버리고 생성물을 메탄올과 물로 여러 번 씻어 준다. 진공 펌프에서 건조시키면 보라색 고체 (157.6mg)를 60.2%의 수율로 얻을 수 있다.

## &lt;20&gt; 2. 인디루빈 옥심 유도체의 합성

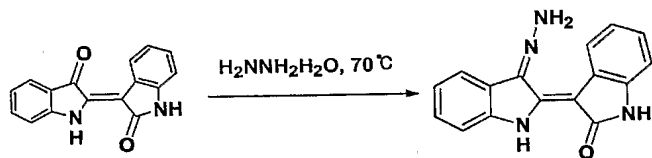
&lt;21&gt;



<22> 인디루빈 (262mg, 1mmol)을 50ml 두 가지(two neck) 둥근바닥 플라스크에 넣고 피리딘 (5ml)에 녹인 다음  $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$  (181mg, 2.6mmol)를 첨가한 후,  $120^\circ\text{C}$  이상에서 2시간 정도 환류 시킨다. TLC( $R_f=0.45$  에틸아세테이트/헥산 1/1 v/v)를 이용하여 반응의 종결을 확인하고 반응 용액의 온도를 실온으로 낮춘다. 조 상태의 물질을 1N HCl(50~100ml) 용액에 붓고 결정이 생기면 여과기를 통과시켜 결정을 얻은 후, 다시 1N NaOH(50ml)에 생성물을 녹인다. 생성물을 모두 녹인 후, 1N HCl(100ml)에서 재결정시켜 건조시킨다. 질은 진보라색 고체 (263.5mg)를 93%의 수율로 얻을 수 있다.

<23> 3.인디루빈 하이드라존 유도체의 합성

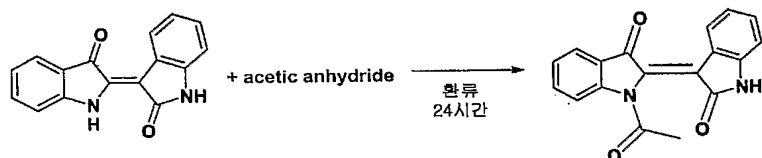
<24>



<25> 50ml의 두 가지 둥근바닥 플라스크에 인디루빈(80mg, 0.3mmol)을 넣고  $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (3ml,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 이용해서 건조시킨 후,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 을 걸러 낸 용액) 온도를  $70 \sim 80^\circ\text{C}$ 에서 가열한다. 하루 정도가 지나면 푸른색 고체가 생성되는데 여과시켜 생성물을 걸러 내고 에테르로 씻어 준다. 정제하기 위해서 생성물을 NMP로 녹인 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 용매(에틸아세테이트/헥산 1/1)로 컬럼하여 순수한 생성물을 얻는다. 이 때 처음에는 헥산으로 계속 씻어 주면서 NMP를 제거해야 한다. 회전 증발기로 용매를 제거하여 건조시키면 10%(8mg)의 수율을 얻을 수 있다.

## &lt;26&gt; 4. 인디루빈 N-아세틸 유도체의 합성

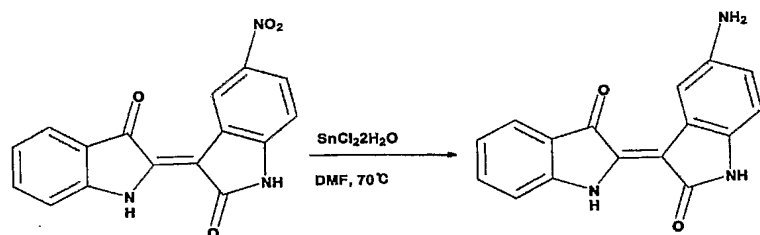
&lt;27&gt;



<28> 50ml의 둥근바닥 플라스크에 인디루빈(314.4mg, 1.2mmol)을 넣고 무수초산(15ml)에 녹인 후, 10시간 동안 환류시킨다. TLC(Rf=0.55 에틸아세테이트/헥산 1/2 v/v)로 반응의 종결을 확인하고, 생성물을 여과하는데 이 때 물로 여러 번 씻어 주고 진공 펌프에서 건조시킨다. 남은 여과액은 동결 건조해서 용매를 제거해서 수율을 더 높이는데 이용할 수 있다. 98%(358mg)의 수율을 얻을 수 있다.

## &lt;29&gt; 5. 인디루빈 아민 유도체의 합성

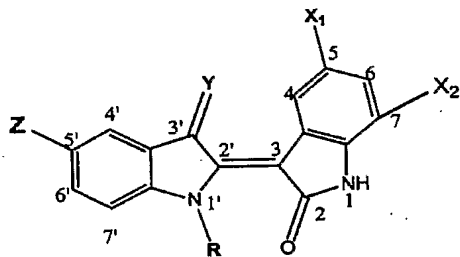
&lt;30&gt;



<31> 50ml 두 가지 둥근바닥 플라스크에 인디루빈-5-니트로(500mg, 1.629mmol)을 넣고 DMF(5ml)에 녹인 후,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.838g, 8.145mmol)를 첨가하여 70℃에서 가열한다. 1시간 후, TLC( $R_f=0.2$   $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  50/1 v/v)을 확인한 후, 반응을 종결시키고 pH가 11이 될 때까지 1N NaOH을 첨가하여 반응 용액을 알칼리성을 만든다. 조 상태의 물질을 분별 깔때기에 옮긴 후, 에틸아세테이트를 이용해서 추출하고 브라인(brine)으로 씻어 준다. 용매를 회전 증발기를 이용하여 제거한 후, 얻은 결정체를 진공 펌프에서 건조시킨다. 45.2%(204mg)의 수율을 얻을 수 있다.

<32> 본 발명에서 항암활성 효과의 측정을 위해 합성한 인디루빈 화합물의 일반식은 다음과 같다.

<33>



<34> 상기 식에서 치환기 위치인  $X_1$ ,  $X_2$ , Y, Z, R에 여러 종의 치환기를 치환시켜 본 발명에서는 AGM001~AGM029의 29개의 화합물을 합성하였으며, 합성된 화합물의 분석을 위한  $^1\text{H}$  NMR(핵자기공명) 데이터 및 MS(메스 스펙트로스코피)는 다음과 같다.

<35> AGM001 화합물의 합성

<36> 1H,1'H-[2,3']비인돌리덴(Biindolylidene)-3,2'-디온(AGM 001)

<37>  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 11.00(1H, s, N-H), 10.87(1H, s, N'-H), 8.76(1H, d,  $J$  =7.4Hz), 7.64(1H, d,  $J$ =7.3Hz), 7.56(1H, t,  $J$  =7.8Hz), 7.41(1H, d,  $J$  =7.8Hz), 7.24(1H, t,  $J$  =7.3Hz), 7.00(2H, m) 6.89(1H, d,  $J$  =7.4Hz)

<38> MS(MALDI -TOF) m/z: 262.7

<39> AGM002 화합물의 합성

<40> 1H,1'H-[2,3']비인돌리덴-3,2'-디온 3-옥심(AGM002)

<41>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.49(1H, s, NOH) 11.74(1H, s, N'-H), 10.74(1H, s, N'-H), 8.65(1H, d,  $J$  =7.8Hz), 8.11(1H, d,  $J$ =7.8Hz), 7.20(2H, m), 7.13(1H, t,  $J$  =7.5Hz), 6.97(4H, m)

<42> MS(MALDI -TOF) m/z: 276.7

<43> AGM006 화합물의 합성

<44> 1-아세틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리덴-3,2'-디온(AGM006)

<45>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.52(1H, s, N'-H), 9.00(1H, dd,  $J=7.8, 1.5\text{Hz}$ ), 8.29(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.73(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.62(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.31(2H, m), 7.03(2H, m)

<46> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 304.2

<47> AGM009 화합물의 합성

<48> 5'-니트로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM009)

<49>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.25(1H, br s, N-H), 11.20(1H, br s, N'-H), 9.64(1H, s), 8.15(1H, dd,  $J=2.3, 8.4\text{Hz}$ ), 7.63(2H, m), 7.42(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.05(2H, m)

<50> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 307.8

<51> AGM010 화합물의 합성

<52> 5'-플루오로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM010)

<53>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.10(1H, br s, N-H), 10.92(1H, br s, N'-H), 8.58(1H, dd,  $J=2.7, 7.8\text{Hz}$ ), 7.62(2H, m), 7.43(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.00(3H, m)

<54> MS(MALDI -TOF) m/z: 280.6

<55> AGM011 화합물의 합성

<56> 5'-니트로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM011)

<57>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.92(1H, s, NOH) 11.90(1H, s, N-H), 11.44(1H, s, N'-H), 9.47(1H, s), 8.27(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 8.10(1H, dd,  $J=2.3, 8.4\text{Hz}$ ), 7.48(2H, m), 7.09(2H, m)

<58> MS(MALDI -TOF) m/z: 321.0

<59> AGM012 화합물의 합성

<60> 5'-플루오로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM012)

<61>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.66(1H, s, NOH) 11.80(1H, s, N-H), 10.75(1H, s, N'-H), 8.48(1H, dd,  $J=2.6, 11.3\text{Hz}$ ), 8.23(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.43(2H, m), 7.00(3H, m)

<62> MS(MALDI -TOF) m/z: 295.2

<63> AGM013 화합물의 합성

<64> 5'-메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM013)

<65>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.40(1H, s, NOH) 11.72(1H, s, N-H), 10.59(1H, s, N'-H), 8.43(1H, s), 8.24(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.39(2H, m), 7.00(2H, m), 6.77(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 2.34(3H, s, CH<sub>3</sub>)

<66> MS(MALDI -TOF) m/z: 291.7

<67> AGM014 화합물의 합성

<68> 5'-클로로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM014)

<69>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.68(1H, s, NOH) 11.83(1H, s, N-H), 10.85(1H, s, N'-H), 8.65(1H, s), 8.24(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.42(2H, m), 7.10(2H, m), 6.88(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ )

<70> MS(MALDI -TOF) m/z: 311.6

<71> AGM015 화합물의 합성

<72> 5'-요도-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM015)

<73>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.67(1H, s, NOH) 11.83(1H, s, N-H), 10.84(1H, s, N'-H), 8.90(1H, s), 8.25(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.40(3H, m), 7.06(1H, s), 6.74(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ )

<74> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 403.7

<75> AGM016 화합물의 합성

<76> 5',7'-디메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM016)

<77>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.38(1H, s, NOH) 11.77(1H, s, N-H), 10.62(1H, s, N'-H), 8.34(1H, s), 8.24(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.39(2H, m), 7.02(1H, s), 6.77(1H, s), 2.31(3H, s,  $\text{CH}_3$ ) 2.22(3H, s,  $\text{CH}_3$ )

<78> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 305.8

<79> AGM017 화합물의 합성

<80> 5'-클로로-7'-메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM017)

<81>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.65(1H, s, NOH) 11.88(1H, s, N-H), 10.88(1H, s, N'-H), 8.52(1H, s), 8.24(1H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.43(2H, m), 7.04(2H, m) 2.22(3H, s,  $\text{CH}_3$ )

<82> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 325.6

<83> AGM018 화합물의 합성

&lt;84&gt; 5-브로모-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM018)

<85>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.74(1H, s, NOH) 11.75(1H, s, N-H), 10.75(1H, s, N'-H), 8.61(1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 8.32(1H, s), 7.57(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) 7.41(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ) 7.14(1H, t,  $J=2.1, 7.8\text{Hz}$ ) 6.92(2H, m)

&lt;86&gt; MS(MALDI -TOF) m/z: 356.6

<87> AGM019 화합물의 합성

<88> 3,2'-디옥소-1,3,1',2'-테트라하이드로-[2,3']비인돌리텐-5'-술포네이트. 나트륨염  
(AGM019)

<89>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.03(1H, s, N-H), 10.95(1H, s, N'-H), 9.11(1H, s), 7.66(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.55(2H, m), 7.42(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.04(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 6.82(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ )

&lt;90&gt; MS(MALDI -TOF) m/z: 364.6

<91> AGM020 화합물의 합성

<92> 3-하이드록시이미노-2'-옥소-1,3,1',2'-테트라하이드로-[2,3']비인돌리텐-5'-술포네이트  
. 나트륨염 (AGM020)

<93>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.70(1H, s, NOH) 11.81(1H, s, N-H), 10.79(1H, s, N'-H), 8.87(1H, s), 8.25(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.43(3H, m) 7.03(1H, m) 6.90(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ )

<94> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 380.3

<95> AGM021 화합물의 합성

<96> 5-브로모-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 (AGM021)

<97>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.11(1H, s, N-H), 10.92(1H, s, N'-H), 8.75(1H, s), 7.74(2H, m), 7.40(1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.27(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.02(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 6.89(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ )

<98> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 341.5

<99> AGM023 화합물의 합성

<100> 5-브로모-5'-니트로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온 3-옥심(AGM023)

<101>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 14.17(1H, s, NOH), 11.90(1H, s, N-H), 11.42(1H, s, N'-H), 9.43(1H, s), 8.36(1H, s), 8.10(1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.60(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.45(1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.05(1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ )

<102> MS(MALDI -TOF) m/z: 401.8

<103> AGM024 화합물의 합성

<104> 5'-메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM024)

<105>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.92(2H, br s, NH & N'H), 8.62(1H, s), 7.60(2H, m), 7.41(1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.03(2H, m), 6.78(1H, s,  $J=7.8\text{Hz}$ ) 2.32(3H, s,  $\text{CH}_3$ )

<106> MS(MALDI -TOF) m/z: 276.4

<107> AGM025 화합물의 합성

<108> 5'-클로로-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM025)

<109>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.11(1H, s, N-H), 11.00(1H, s, N'-H), 8.79(1H, s), 7.62(2H, m), 7.42(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.28(1H, dd,  $J=2.1, 8.4\text{Hz}$ ), 7.04(1H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 6.90(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ )

<110> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 296.5

<111> AGM026 화합물의 합성

<112> 5'-요도-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM026)

<113>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.07(2H, br s, NH & N'H), 9.11(1H, s), 7.61(3H, m), 7.42(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.04(1H, t,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 6.75(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ )

<114> MS(MALDI -TOF)  $m/z$ : 388.5

<115> AGM027 화합물의 합성

<116> 5',7'-디메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM027)

<117>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.03(1H, br s, N-H), 10.83(1H, br s, N'-H), 8.48(1H, s), 7.59(2H, m), 7.40(1H, br s), 7.00(1H, br s), 6.88(1H, br s) 2.23(6H, m, 5',7' $\text{CH}_3$ )

<118> MS(MALDI -TOF) m/z: 290.7

<119> AGM028 화합물의 합성

<120> 5'-클로로-7'-메틸-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM028)

<121>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.11(1H, s, N-H), 11.04(1H, s, N'-H), 8.64(1H, s), 7.60(2H, m), 7.42(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.12(1H, s), 7.03(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ) 2.22(3H, s,  $\text{CH}_3$ )

<122> MS(MALDI -TOF) m/z: 310.7

<123> AGM029 화합물의 합성

<124> 5'-아미노-1H,1'H-[2,3']비인돌리텐-3,2'-디온(AGM029)

<125>  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.95(1H, s, N-H), 10.45(1H, s, N'-H), 8.15(1H, s), 7.58(2H, m), 7.39(1H, d,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.00(1H, t,  $J=7.5\text{Hz}$ ) 6.56(2H, m), 4.75(2H, s,  $\text{NH}_2$ )

<126> MS(MALDI -TOF) m/z: 276.9

1020040005114

출력 일자: 2005/1/18

127>      상기 AGM001~AGM029 화합물의  $X_1$ ,  $X_2$ , Y, Z, R 치환기의 형태를 하기 표 1에  
나타내었다.

128>

【표 1】

entry	X1	X2	Y	Z	R
AGM001	H	H	O	H	H
AGM002	H	H	NOH	H	H
AGM003	CF <sub>3</sub> O	H	O	H	H
AGM004	CF <sub>3</sub> O	H	NOH	H	H
AGM005	H	H	NNH <sub>2</sub>	H	H
AGM006	H	H	O	H	CH <sub>3</sub> CO
AGM007	H	H	O	Br	CH <sub>3</sub> CO
AGM008	CF <sub>3</sub> O	H	O	H	CH <sub>3</sub> CO
AGM009	NO <sub>2</sub>	H	O	H	H
AGM010	F	H	O	H	H
AGM011	NO <sub>2</sub>	H	NOH	H	H
AGM012	F	H	NOH	H	H
AGM013	CH <sub>3</sub>	H	NOH	H	H
AGM014	Cl	H	NOH	H	H
AGM015	I	H	NOH	H	H
AGM016	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NOH	H	H
AGM017	Cl	CH <sub>3</sub>	NOH	H	H
AGM018	H	H	NOH	Br	H
AGM019	SO <sub>3</sub> -Na <sup>+</sup>	H	O	H	H
AGM020	SO <sub>3</sub> -Na <sup>+</sup>	H	NOH	H	H
AGM021	H	H	O	Br	H
AGM022	NO <sub>2</sub>	H	O	Br	H

<129> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 본 실시예들로 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

<130> (실시예 1) 인디루빈 유도체의 각종 암세포주 증식에 미치는 영향분석

<131> 본 실시예에서 인디루빈 유도체의 암세포 증식 억제활성을 측정하기 위해 인간 폐암 세포주(A549), 인간 위암 세포주(SNU-638), 인간 대장암 세포주(Co12), 인간 복강암 세포주(HT 1080), 인간 백혈병 세포주(HL-60)의 암세포 증식 억제활성을 시험관 내에서 측정하였다.

<132> 측정방법은 K. Likhitwitayawuid 등이 Journal. Nat. Prod. 58(1993) 1468-1478에서 개시한 방법으로 측정하였다. 이를 간단히 살펴보면 세포주를  $5 \times 10^4$  개/ml 이 되도록 희석시킨 후 96웰 마이크로 타이터 플레이트에 다양한 농도로 시험물질을 첨가시킨다. 시험 플레이트를 37℃에서 3~4일 동안 인큐베이션시킨 후 건조시키고 트리스베이스로 용해시킨 후 ELISA 플레이트 측정기를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. IC<sub>50</sub> 치는 비선형 회귀분석법을 이용하여 계산한다. 각 화합물의 암세포 증식 억제활성을 표 2에 나타내었다.

133&gt; 【표 2】

인디루빈 유도체의 암세포 증식억제 활성

화합물	IC50, (Ma)				
	A549	SNU-638	Co12	HT108	HL60
AGM001	31.0	> 100	> 100	42.2	
AGM002	62.0	> 100	> 100	4.8	
AGM003	> 100	> 100	> 100		> 100
AGM004	9.6	23.1	> 100	32.1	
AGM005	98.2	> 100	> 100	40.8	
AGM006	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM007	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM008	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM009	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM010	96.8	40.3	> 100	> 100	> 100
AGM011	5.43	1.21	25.5	5.87	9.23
AGM012	13.2	2.06	64.2	3.41	89.3
AGM013	20.4	17.6	> 100	36.7	65.4
AGM014	12.1	6.22	16.8	10.8	4.81
AGM015	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM016	> 100	90.6	> 100	> 100	> 100
AGM017	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM018	38.6	32.9	10.5	73.6	25.0
AGM019	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM020	> 100	> 100	> 100	> 100	47.0
AGM021	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM022	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AGM023	23.2	12.06	44.2	4.41	69.3
AGM024	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

<134> 시험결과 AGM011, AGM012, AGM014, AGM023, AGM029 등의 화합물이 각종 암세포주에 유의성있는 성장 억제활성을 나타내었다.

<135> (실시예 2) 인디루빈 유도체 화합물의 HL-60 백혈병 세포주의 분화에 미치는 영향 분석

<136> AGM 화합물이 급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포분화에 어떤 영향을 미치는지를 분석하기 위해, NBT (nitroblue tetrazolium) 환원반응 검사법을 이용하였다. 먼저 화합물을  $2 \times 10^5$  세포/ml 에 20 mM와 1 mM의 농도로 처리한 후, 3일 간 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포는 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척한 후, 0.1 % NBT와 200ng/ml의 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 함유한 PBS 용액에, 37℃에서 30분간 배양한다. 배양된 세포는 원심분리기를 이용해서 모은 다음 PBS용액으로 세척하고, 세포수계수기를 이용하여 총 세포 중 nitroblue formazan을 형성하는 분화된 세포를 계수하여 백분율로 나타낸다. 화합물을 처리한 결과 AGM029가 20 mM의 농도에서 높은 비율로 분화를 유도함을 알 수 있었다(표 3).

<137>

【표 3】

HL-60 백혈병 세포주 분화유도에 인디루빈 및 그 유도체가 미치는 영향

화합물	% 디퍼런시메이션		
	20 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
미디어	1.80 $\pm$ 0.29	3.08 $\pm$ 1.29	
1	10.00 $\pm$ 0.27	7.76 $\pm$ 3.42	
2	6.78 $\pm$ 0.40	11.12 $\pm$ 0.31	
3	10.36 $\pm$ 0.29	6.27 $\pm$ 1.76	
4	-	22.81 $\pm$ 2.38	
6	10.49 $\pm$ 0.25	9.99 $\pm$ 1.47	
9	29.26 $\pm$ 1.59	19.94 $\pm$ 2.02	
10	13.01 $\pm$ 0.14	7.53 $\pm$ 1.02	
11	-	-	24.02 $\pm$ 0.85
12	-	32.71 $\pm$ 1.73	
13	-	28.22 $\pm$ 2.04	
14	-	40.97 $\pm$ 1.19	
15	-	30.50 $\pm$ 4.97	
16	10.35 $\pm$ 0.62	3.07 $\pm$ 1.69	
17	2.62 $\pm$ 0.23	8.37 $\pm$ 0.45	
18	-	8.69 $\pm$ 4.95	
19	12.44 $\pm$ 1.66	9.36 $\pm$ 0.13	
20	23.86 $\pm$ 1.31	11.34 $\pm$ 2.32	
21	9.64 $\pm$ 0.51	11.63 $\pm$ 3.48	
22	22.89 $\pm$ 0.51	18.35 $\pm$ 0.02	
23	-	-	18.38 $\pm$ 0.27
24	14.38 $\pm$ 0.42	24.89 $\pm$ 6.05	
25	14.40 $\pm$ 0.82	26.18 $\pm$ 0.59	
26	22.23 $\pm$ 0.60	29.84 $\pm$ 1.12	
27	4.75 $\pm$ 0.41	9.45 $\pm$ 0.92	
28	0.70 $\pm$ 0.16	8.85 $\pm$ 2.20	
29	-	45.05 $\pm$ 0.59	
인디루빈	1.18 $\pm$ 0.18	15.28 $\pm$ 1.12	

&lt;138&gt;

다음으로 급성 전골수성 백혈병의 분화유도 치료제로 널리 알려진

1,25-dihydroxyvitamin D3[1,25-(OH)2D3]나 all-*trans* retinoic acid (ATRA)의 낮은 농도와 혼합하여 처리하였을 때 AGM 화합물이 분화유도를 상승적으로 유도하는 지를 탐색하기 위하여, 20~30 % 정도의 분화를 유도하는 저농도의 1,25-(OH)2D3와 ATRA를 1 mM의 AMG 화합물과 함께 처리하여 3일간 배양하였다. NBT 환원반응을 검사한 결과, AGM010과 AGM029가 1,25-(OH)2D3

와 ATRA가 유도한 분화를 70 %이상 증가시킴을 알 수 있었으며, AGM023은 세포독성이 관찰되었으나 0.2 mM의 낮은 농도로 기존 분화 유도제와 혼합 처리하였을때 양성대조군으로 사용한 높은 농도의 기존 분화 유도제의 활성과 대등한 효과를 보였다(표 4).

## 139&gt; 【표 4】

5nM 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 또는 50nM all-trans RA와 병용시 백혈병 세포주 분화에 미치는 인디루빈 및 그 유도제의 상승효과

화합물 1 μM	% 디퍼렌시메이션	
	1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	all-trans RA
미디어	19.21 ± 1.23	28.75 ± 2.65
1	28.36 ± 0.15	39.61 ± 1.25
2	24.52 ± 2.67	37.78 ± 1.06
3	22.04 ± 0.38	41.01 ± 1.26
4	28.36 ± 3.05	28.68 ± 0.23
6	19.60 ± 0.56	42.81 ± 1.05
9	48.51 ± 3.49	59.32 ± 1.54
10	78.44 ± 6.88	75.08 ± 6.80
11	-	-
12	24.29 ± 1.34	54.81 ± 1.65
13	35.49 ± 5.45	70.54 ± 2.17
14	21.72 ± 1.22	72.40 ± 3.05
15	33.27 ± 0.75	67.41 ± 1.36
16	27.24 ± 1.32	33.99 ± 0.47
17	22.10 ± 0.90	43.17 ± 1.56
18	36.52 ± 1.27	23.13 ± 0.71
19	27.66 ± 1.28	51.49 ± 0.13
20	23.34 ± 0.65	34.50 ± 2.91
21	24.64 ± 0.65	28.23 ± 0.02
22	48.28 ± 0.36	51.20 ± 3.70
23	-	-
24	41.66 ± 0.40	51.01 ± 0.88
25	49.41 ± 0.08	48.39 ± 1.48
26	44.43 ± 0.09	60.33 ± 0.51
27	21.74 ± 1.90	43.19 ± 1.73
28	35.22 ± 0.55	55.57 ± 1.11
29	79.03 ± 0.55	78.81 ± 0.77
인디루빈	25.39 ± 0.98	44.87 ± 2.54
0.2 μM		
11	31.79 ± 0.87	34.87 ± 0.74
23	89.76 ± 0.88	90.85 ± 0.36
P 대조군	85.95 ± 1.43	90.33 ± 0.13

40> 실시예 1 및 실시예 2를 통하여 AGM023 화합물이 항암활성 효과가 가능 우수함을 발견하였다. 또한 AGM011, AGM029, AGM012, AGM014 화합물도 각종 암세포주에 항암활성효과를 나타내는 것으로 판명되었다. 이는 통상의 인디루빈 유도체에서 예측되는 항암활성 효과보다 월등히 우수한 것으로 본 발명에서 상기 5종의 화합물이 항암활성제로 사용할 수 있음을 발명한 것이다.

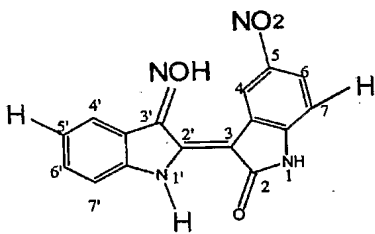
#### 【발명의 효과】

<141> 본 발명의 효과는 인디루빈 유도체 중 AGM011, AGM029, AGM012, AGM014 화합물도 각종 암세포주에 항암활성효과를 나타내는 것으로 발명한 것이다. 이는 통상의 인디루빈 유도체에서 예측되는 항암활성 효과보다 월등히 우수한 것으로 본 발명에서 상기 5종의 화합물이 항암활성제로 사용할 수 있음을 발명한 것이다.

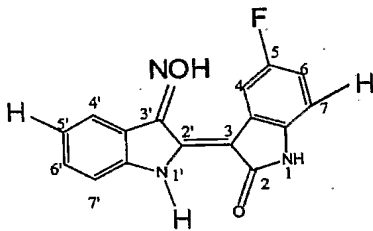
## 【특허청구범위】

## 【청구항 1】

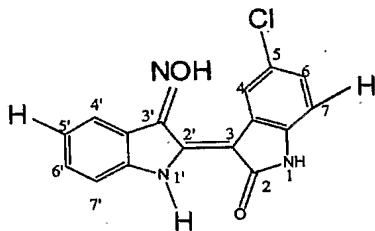
하기 구조식 (I)~(V)로 표시되는 인간 암세포주에 항암활성 및 백혈병 세포주에 분화 유도를 통한 세포사멸 효능을 지니고 싸이클린-디펜던트 키나제(CDK) 저해 활성을 지닌 인디루빈 화합물



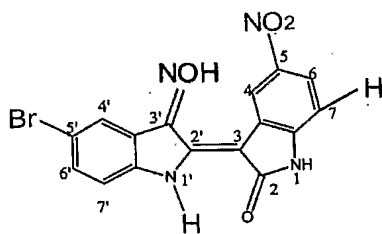
(I)



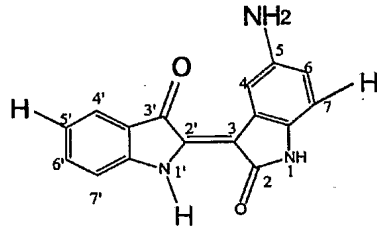
(II)



(III)



(IV)



(V)

## 【청구항 2】

상기 구조식 (I)~(V)로 표시되는 인디루빈 화합물을 1종 이상 포함하는 항암활성제  
조성물